

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS NATIVAS DE LACTOBACILLUS AISLADAS DE MATERIAL DE CAMA DE POLLOS DE ENGORDE

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NATIVE STRAINS OF LACTOBACILLUS ISOLATES FROM POULTRY LITTER

Carlos Shiva^{1,3}, Luis M. Jara²

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar bacterias del género *Lactobacillus* provenientes de material de cama de 1 a 3 usos con bajos registros de amoníaco de granjas de pollos de engorde. Se evaluó la resistencia a condiciones de pH 5 y 8, así como la capacidad de inhibición sobre bacterias con actividad ureasa (*Staphylococcus* spp y *Pseudomona* spp) aisladas a partir de material de cama. Se aislaron 73 colonias consideradas como sospechosas de *Lactobacillus* a partir de siembra en medios selectivos y patrones morfológicos. Mediante tinción de Gram y prueba de catalasa se comprobó que 19 cepas correspondieron al género *Lactobacillus* y con PCR se encontró que el 53% correspondió a *L. reuteri*, el 32% a *L. plantarum*, el 10% a *L. vaginalis* y el 5% a *L. salivarius*. Todas las cepas sobrevivieron a condiciones de pH 5 y 8 y todas produjeron algún tipo de biocina activa contra *Staphylococcus* spp o *Pseudomonas* spp que podrían ser útiles a futuro como aditivo para regular la microbiota en el material de cama.

Palabras clave: *Lactobacillus*, pollos de engorde, probióticos, aislamiento, amoníaco

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and identify bacteria of *Lactobacillus* genus from poultry litter with 1, 2 or 3 uses and low ammonia records. Resistance for conditions at pH 5 and 8 was evaluated as well as the ability to inhibit activity in urease bacteria (*Staphylococcus* spp and *Pseudomona* spp) isolated from poultry litter. Seventy three suspected colonies of *Lactobacillus* were identified by culture in selective media and

¹Laboratorio de Microbiología, ²Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³E-mail: carlos.shiva@upch.pe

Recibido: 23 de noviembre de 2012

Aceptado para publicación: 15 de abril de 2013

morphological patterns. Gram staining and catalase test revealed that only 19 strains were of *Lactobacillus* genus. Furthermore, through PCR was found that 53% corresponded to *L. reuteri*, 32% to *L. plantarum*, 10% to *L. vaginalis* and 5% to *L. salivarius*. All isolates survived at conditions of pH 5 and 8 and all strains produced some type of active biocin against *Staphylococci* spp or *Pseudomona* spp which might be useful as additive to regulate the microbiota in poultry litter.

Key words: *Lactobacillus*, broiler, probiotics, isolation, ammonia

INTRODUCCIÓN

El uso de bacterias probióticas ha sido el resultado de búsquedas de alternativas para la mejora del crecimiento de los pollos de engorde, luego de la prohibición del uso de antibióticos como promotores de crecimiento por parte de la Unión Europea (Shiva, 2007). El término probiótico ha sido utilizado para designar a aquellos microorganismos que al ser administrados en el alimento ejercen una acción moduladora sobre la microflora intestinal, mejorando la respuesta inmunitaria y logrando un mejor estado sanitario. Los microorganismos probióticos más representativos son los pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, cuya acción benéfica se atribuye principalmente a la producción de ácidos orgánicos, además de algunas biocinas que inhiben el crecimiento de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp y *Salmonella* spp (Valdés *et al.*, 2005; Parra, 2010).

Se sabe además que el modo de acción de algunas especies de *Lactobacillus* en aves incluye el mantenimiento normal de la microbiota intestinal por exclusión competitiva y antagonismo, incrementando la actividad digestiva y reduciendo la actividad enzimática microbiana y productora de amonio (Kabir, 2009). Así por ejemplo, cepas de *Lactobacillus casei* confieren protección contra coccidias, mejorando la ganancia de peso y obteniendo un índice anticoccidial si-

milar al obtenido cuando se utiliza una vacuna comercial contra *Eimeria* (Bautista *et al.*, 2003). Otras propiedades importantes demostradas *in vitro* incluyen la reducción de sulfuro y amonio (Naidu, 2002), así como la reducción de compuestos orgánicos volátiles dentro de los galpones (Chang y Chen, 2003), los cuales involucran procesos mediados por bacterias con actividad ureasa capaces de hidrolizar la urea en amoniaco, lo que afecta la integridad respiratoria del ave y disminuye su rendimiento (Rothrock *et al.*, 2010).

Se dispone de escasos estudios sobre caracterización de la población de especies de *Lactobacillus* nativas en material de cama de aves comerciales. Han sido reportadas especies como *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. agilis* y *L. salivarius*, entre otras (Paço *et al.*, 2003), desconociéndose el rol que cumplen dentro de la comunidad microbiana de la cama.

Los objetivos del presente estudio fueron aislar e identificar las especies nativas de *Lactobacillus* provenientes de cama de galpones de pollos con registros de bajos niveles de amoniaco, así como evaluar su capacidad de resistencia a diferentes niveles de pH y actividad inhibitoria sobre dos cepas bacterianas con actividad ureasa, con la finalidad de establecer las bases de un producto biológico útil para el control de las poblaciones microbianas involucradas en la producción elevada de amoniaco en granjas de aves comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio y Muestras

Se seleccionaron 35 galpones correspondientes a siete planteles comerciales de pollos broiler de la costa central del Perú, comprendidas entre Cerro Azul al sur y Huacho al norte. Las granjas pertenecían al mismo consorcio avícola y los niveles de amoníaco en los galpones era bajo (no mayor a 13 ppm en su record histórico).

Las aves tenían entre 30 y 38 días, de acuerdo a la disponibilidad de ingreso a los planteles. Las camas eran de segundo a cuarto uso. De cada galpón se recolectaron 300 g de material de cama en bolsas estériles. Las muestras se transportaron a 4 °C al laboratorio de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, para su procesamiento (Paço *et al.*, 2003).

La medición del nitrógeno en los galpones se hizo con un equipo electrónico portátil a la altura del pico de las aves, semanalmente y a una misma hora durante cada campaña de crianza, realizado por el encargado de cada granja.

Identificación Microbiológica

Se colocó 5 g de material de cama en 40 ml de caldo MRS y se incubó a 37 °C por 24 h. Luego, se traspasó hacia el medio MRS suplementado con ácido acético (1.32 ml/L) a través de una siembra por agotamiento. Las placas se incubaron en anaerobiosis por 48 h.

Las colonias resultantes se consideraron como sospechosas de *Lactobacillus* si eran blanquecinas y pequeñas, Gram positivas, catalasa negativa y morfología bacilar no esporuladas. Las cepas fueron conservadas en alícuotas en crioviales con caldo MRS y glicerol al 20%.

Identificación Molecular

Se procedió con la extracción del ADN genómico de cada cepa de acuerdo a las indicaciones del kit comercial Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen®, EEUU). El espacio intergénico 16S-23S se amplificó mediante la técnica de PCR, utilizando los cebadores y condiciones descritas por Dubernet *et al.* (2002) para la identificación molecular de *Lactobacillus* a nivel de género. Asimismo, para la identificación a nivel de especie se utilizaron los cebadores y protocolos descritos por Song *et al.* (2000) y Berthier y Ehrlich (1998) para la técnica de PCR múltiple, usando como controles a cepas comerciales de *L. plantarum* ATCC 8014, *L. delbrueckii* ATCC 7830, *L. acidophilus* ATCC 4356 y *L. reuteri* Protetics BioGaia®.

Crecimiento según pH

Por evaluar la resistencia y crecimiento a diferentes niveles de pH de las cepas seleccionadas, el medio MRS se ajustó a pH 5 y pH 8 mediante adición de ácido clorhídrico 0.1 N e hidróxido de sodio 0.1 N, respectivamente. La concentración de las cepas fue ajustada a escala 2 de McFarland y 20 µl de la suspensión fue inoculada en 200 µl de medio MRS líquido ajustado al pH requerido en pocillos de fondo plano de placas para ELISA (por triplicado). El crecimiento bacteriano fue medido en un espectrofotómetro para microplacas a una densidad óptica (OD) de 620 nm a las 0 y 24 h de la incubación, y el resultado fue comparado con un estándar del caldo MRS sin *Lactobacillus* (Weesel *et al.*, 2004).

Los resultados se expresaron como índice de crecimiento bacteriano (ICB). Para esto, se midió la OD a las 0 h de inoculado y se dividió entre la OD del mismo pocillo transcurridas 24 h. Asimismo, el ICB se midió en una escala de 0 a 1, considerándose las cepas bacterianas con mejor ICB a aquellas con los valores numéricos más bajos.

Actividad Inhibitoria

Para la medición de la actividad inhibitoria frente a patógenos se utilizó el método de difusión en agar según Hechard *et al.* (1990). Una cepa de *Staphylococcus* spp y otra de *Pseudomonas* spp, ambas con actividad ureasa provenientes del material de cama de uno de los planteles en estudio, fueron aisladas e identificadas de acuerdo a protocolos estándar de laboratorio de microbiología (Win *et al.*, 2008).

Se preparó una suspensión a escala 0.5 de Mcfarland de ambas cepas y se sembraron en placas de agar tripticasa de soya (TSA) en tres direcciones; se dejaron secar por 5 min y se depositó en su superficie cuatro porciones de agar MRS de 2 cm de diámetro conteniendo cuatro cepas diferentes de *Lactobacillus* a evaluar. Se incubó a 37 °C y las lecturas se hicieron a las 24 y 48 h. Los resultados se expresaron en radio de inhibición, medido en centímetros, que fue la medida formada alrededor de la porción de agar con la cepa de *Lactobacillus* sembrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron 73 cepas sospechosas y 19 fueron confirmadas a nivel molecular como integrantes del género *Lactobacillus*. De estas, el 53% correspondió a *L. reuteri*, el 32% a *L. plantarum*, el 10% a *L. vaginalis* y el 5% a *L. salivarius*. Las cepas fueron identificadas a nivel de especie mediante la técnica de PCR múltiple, a diferencia del empleo de métodos bioquímicos, en donde el patrón fenotípico resultante puede ser similar entre dos especies genéticamente diferentes, como se demostró en el estudio de Teanpaisan y Dahlén (2006), donde *L. salivarius* y *L. acidophilus* fueron identificados como *L. fermentum*.

L. plantarum ha sido encontrada en el suelo de granjas de pollos en Senegal (Ibourahema *et al.*, 2008). Asimismo, las de-

más especies han sido reportadas en Brasil (Paço *et al.*, 2003), a excepción de *L. vaginalis* que fue identificado en dos cepas en el presente estudio. Esta especie se le encuentra usualmente en el tracto genital de las mujeres (Vásquez *et al.*, 2002), aunque también ha sido aislada del tracto gastrointestinal de pollos broiler (Stephenson *et al.*, 2009), pero se desconoce su importancia dentro de la flora microbiana endógena del intestino y su aplicación como probiótico en aves comerciales.

Los aislados a partir de material de cama sugieren que dichas especies se encuentran colonizando de forma activa el tracto intestinal en las aves. *L. salivarius* ha sido identificada a partir de íleon y ciego de pollos de engorde (Rondón *et al.*, 2008) y *L. salivarius* y *L. reuteri* en muestras de cloaca (Cauwerts *et al.*, 2006). Igualmente, *L. crispatus*, *L. salivarius*, *L. reuteri* y *L. johnsonii* han sido recientemente encontradas en intestino y ciego de broilers (Majidzadeh *et al.*, 2011), lo que demuestra que más de una especie puede ser aislada de las excretas, pudiendo además ser un indicativo de la microbiota gastrointestinal en condiciones normales.

Factores como la dieta, temperatura, pH, reutilización de material de cama, y la localización en intestino determinan la presentación de determinadas especies de *Lactobacillus* en aves (Paço *et al.*, 2003); por ejemplo, en íleon se han reportado otras especies mesofílicas como *L. colehominis*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* y *L. mucosae*, donde además, *L. crispatus* y *L. salivarius* se encontraron mayoritariamente en pollos orgánicos mientras que *L. salivarius* y *L. johnsonii* prevalecieron en aves convencionales (Bjerrum *et al.*, 2006). De igual forma, *L. acidophilus* ha sido aislada de heces de broilers (Lee *et al.*, 2008) y del buche, íleon y ciego (Guan *et al.*, 2005) y la especie termotolerante *L. thermotolerans* ha sido aislada de heces (Niamsup *et al.*, 2003). Asimismo, otros estudios indican que la composición endógena de *Lactobacillus* y otras bacterias en intestino está más influenciada por

Cuadro 1. Índice de crecimiento bacteriano (ICB) de cepas de *Lactobacillus* a dos niveles de pH

Especie de <i>Lactobacillus</i>	Código de cepa	ICB a pH 5	ICB a pH 8
<i>L. reuteri</i>	3	0.088	0.077
<i>L. vaginalis</i>	15	0.127	0.215
<i>L. vaginalis</i>	20	0.117	0.203
<i>L. reuteri</i>	12 y 13	0.113	0.083
<i>L. reuteri</i>	25	0.103	0.116
<i>L. reuteri</i>	26	0.077	0.203
<i>L. plantarum</i>	27a	0.111	0.279
<i>L. plantarum</i>	27b	0.101	0.202
<i>L. plantarum</i>	27c	0.090	0.083
<i>L. plantarum</i>	27d	0.130	0.185
<i>L. plantarum</i>	27e	0.125	0.200
<i>L. plantarum</i>	28a	0.111	0.189
<i>L. reuteri</i>	28b	0.103	1.090
<i>L. reuteri</i>	29	0.110	0.274
<i>L. salivarius</i>	30	0.062	0.153
<i>L. reuteri</i>	31a	0.096	0.089
<i>L. reuteri</i>	31b	0.144	0.089
<i>L. reuteri</i>	34a	0.107	0.114
<i>L. reuteri</i>	34b	0.156	0.242

el medio ambiente que por la genética del organismo hospedador (de Waard *et al.*, 2002), incluyendo además la edad y el material de elección para la cama (Torok *et al.*, 2007); lo que explicaría la diversidad de especies de *Lactobacillus* que pueden ser aisladas en aves vivas o a partir de cama.

Las cepas de *Lactobacillus* con mayor crecimiento, luego de 24 horas a niveles de pH 5, correspondieron a *L. salivarius* (cepa #30) y *L. reuteri* (cepa #3), mientras que a pH 8 fue *L. reuteri* (cepas #3, 12 y 13) (Cuadro 1). Los diferentes ICB registrados en las cepas aisladas sugieren que la adaptabilidad a diversos niveles de pH está modulada por factores de crecimiento propios de cada cepa.

Recientemente se ha sugerido que las proteínas de superficie de ciertas cepas de *Lactobacillus* estarían asociadas al crecimiento y supervivencia a niveles de pH bajo (Hossein *et al.*, 2010).

Todas las cepas presentaron actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus* spp luego de 24 h, pero solo el 63% a las 48 h. Asimismo, el 68% de las cepas presentó actividad inhibitoria frente a *Pseudomonas* spp a las 24 h y el 26% a las 48 h (Cuadro 2). Además, solo las cepas 15 y 30 no mostraron reducción del halo inhibitorio entre las 24 y 48 h de incubación frente a *Staphylococcus* spp y *Pseudomonas* spp, respectivamente.

Cuadro 2. Actividad inhibitoria¹ de cepas de *Lactobacillus* obtenidas de cama de pollos de engorde frente a *Pseudomonas* spp y *Staphylococcus* spp

Código de cepa	Después de 24 h		Después de 48 h	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
3	---	0.20	---	---
12 y 13	---	2.00	---	1.00
15	---	0.20	---	0.20
20	---	0.10	---	---
25	0.15	0.20	---	0.10
26	1.00	2.00	---	1.00
27a	3.00	5.00	---	---
27b	2.00	4.00	---	---
27c	1.00	3.00	---	1.00
27d	1.50	3.00	---	1.00
27e	2.00	3.00	---	1.50
28a	2.00	4.00	---	---
28b	0.15	0.25	0.05	0.15
29	2.50	3.00	0.50	1.00
30	3.00	6.00	3.00	3.00
31a	1.00	2.50	---	---
31b	---	3.00	---	1.00
34a	0.15	0.30	---	---
34b	---	3.00	---	2.00
Agar solo	---	---	---	---

¹ Expresada en centímetros del radio de inhibición desde el borde de la porción de agar con *Lactobacillus*

Las bacterias ácido lácticas producen biocinas extracelulares con actividad bactericida o bacteriostática, las cuales desestabilizan la membrana citoplasmática bacteriana y alteran su permeabilidad (Nithya *et al.*, 2012). Además, producen ácidos orgánicos, diacetil y enzimas inhibitorias, los cuales en conjunto tienen actividad antagónica contra la microflora competitiva e inhiben su crecimiento (Mohankumar, 2011). La secreción de biocinas alcanza su mayor producción durante la fase de crecimiento exponencial (Sumathi y Reetha, 2012), de allí

que la reducción de la actividad inhibitoria en algunas cepas del presente estudio podría explicarse por el tiempo transcurrido (48 horas) coincidente con la fase estacionaria.

La variación del grado de inhibición entre cepas aisladas frente a los dos patógenos evaluados demanda estudios adicionales con la finalidad de aislar, purificar y caracterizar los compuestos activos con actividad antimicrobiana presentes en las cepas que mostraron mayor actividad inhibitoria *in vitro*. La capacidad productora de bacteriocinas de

L. salivarius aislado de ciego de pollos ha sido demostrada frente a especies de *Campylobacter* (Messaoudi *et al.*, 2011). En forma similar, una bacteriocina de la cepa *L. plantarum* F12 contra *Listeria monocytogenes* (Sifour *et al.*, 2012) y la cepa TN627 contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica* (Bejar *et al.*, 2011). Así también, la reuterina proveniente de *L. reuteri* en concentraciones cercanas a los 30 µg/ml ha resultado útil como antimicrobiano contra patógenos entéricos como *Salmonella* y *Campylobacter* (Edens, 2003), lo que posibilita además una alternativa para la reducción de la diseminación de bacterias zoonóticas asociadas a alimentos.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 19 cepas nativas del género *Lactobacillus* de material de cama de broilers con bajo nivel de amoníaco, correspondiendo a las especies *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. vaginalis* y *L. salivarius*.

Agradecimientos

El presente estudio fue realizado gracias al financiamiento del Proyecto 123-FINCyT-PIEI-2010. Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Giuseppe Blaiotta por las facilidades técnicas para la confirmación de la identificación de las cepas de *Lactobacillus*.

LITERATURA CITADA

1. **Bautista C, Arriola M, Trejo L, Ixta O, Rojas E. 2003.** Comparación entre el efecto de *Lactobacillus casei* y el de una vacuna comercial en pollos contra la coccidiosis. *Tec Pec Mex* 41: 317-327.
2. **Bejar W, Farhat-Khemakhem A, Smaoui S, Makni M, Farhat M, Abdelmalek B, et al. 2011.** Selection of *Lactobacillus plantarum* TN627 as a new probiotic candidate based on *in vitro* functional properties. *BBE* 16: 1115-1123.
3. **Berthier F, Ehrlich S. 1998.** Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol Lett* 161: 97-106.
4. **Bjerrum L, Engberg R, Leser T, Jensen B, Finster K, Pedersen K. 2006.** Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Sci* 85: 1151-1164.
5. **Cauwerts K, Pasmans F, Devriese L, Martel A, Haesebrouck F, Decostere A. 2006.** Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers show high prevalence of resistance towards macrolide and lincosamide antibiotics. *Avian Pathol* 35: 160-164.
6. **Chang M, Chen T. 2003.** Reduction of broiler house malodor by direct feeding of a *Lactobacilli* containing probiotic. *Int J Poultry Sci* 5: 313-317.
7. **de Waard R, Snel J, Bokken G, Tan P, Schut F, Huis In't Veld J. 2002.** Comparison of faecal *Lactobacillus* populations in experimental animals from different breeding facilities and possible consequences for probiotic studies. *Lett Appl Microbiol* 34: 105-109.
8. **Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. 2002.** A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* 214: 271-275.
9. **Edens F. 2003.** An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. *Rev Bras Cienc Avic* 5: 75-97.
10. **Guan L, Hagen K, Grayson T, Tannock G, Korver D, Fassenko G, Allison G. 2005.** Detection of *Lactobacillus acidophilus* species in the gut of chickens. In: *Proc XVII Australian Poultry Science Symposium*. Sydney.
11. **Hechard Y, Dherbomez M, Cenatiempo Y, Letellier F. 1990.** Antagonism of lactic acid bacteria from goat's milk against pathogenic strains assessed by

- the 'sandwich method'. *Lett Appl Microbiol* 11: 185-188.
12. **Hossein N, Stenzel D, Britz M. 2010.** Effect of growth at low pH on the cell surface properties of a typical strain of *Lactobacillus casei* group. *Iran J Microbiol* 2: 144-151.
 13. **Ibourahema C, Dauphin R, Jacqueline D, Thonart P. 2008.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from poultry farms in Senegal. *Afr J Biotechnol* 7: 2006-2012.
 14. **Kabir S. 2009.** The role of probiotics in the poultry industry. *Int J Mol Sci* 10: 3531-3546.
 15. **Lee N, Yun C, Kim S, Chang H, Kang C, Paik H. 2008.** Screening of Lactobacilli derived from chicken feces and partial characterization of *Lactobacillus acidophilus* A12 as an animal probiotics. *J Microbiol Biotechnol* 18: 338-342.
 16. **Majidzadeh Heravi R, Kermanshahi H, Sankian M, Nassiri MR, Heravi Moussavi A, Roozbeh Nasiraii L, Varasteh AR. 2011.** Screening of lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic. *Afr J Microbiol Res* 5: 1858-1868.
 17. **Messaoudi S, Kergourlay G, Rossero A, Ferchichi M, Prévost H, Drider D, et al. 2011.** Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*. *Int Microbiol* 14: 103-110.
 18. **Mohankumar A. 2011.** Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* isolated from raw cattle milk sample. *Int J Biol* 3: 128-143.
 19. **Naidu AS, Xie X, Leumer DA, Harrison S, Burrill MJ, Fonda EA. 2002.** Reduction of sulfide, ammonia compounds, and adhesion properties of *Lactobacillus casei* strain KE99 *in vitro*. *Curr Microbiol* 44: 196-205.
 20. **Niamsup P, Sujaya I, Tanaka M, Sone T, Hanada S, Kamagata Y, et al. 2003.** *Lactobacillus thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 263-268.
 21. **Nithya K, Senbagam D, Senthilkumar B, Udhayashree N, Gurusamy R. 2012.** Characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria and its application as a food preservative. *Afr J Microbiol Res* 6: 1138-1146.
 22. **Paço R, Leme I, Bottino J, Piantino A. 2003.** Identification of *Lactobacillus* spp from broiler litter in Brazil. *Braz J Microbiol* 34: 236-237.
 23. **Parra R. 2010.** Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Rev Bio Agro* 8: 93-105.
 24. **Rondón AJ, Samaniego LM, Bocourt R, Rodríguez S, Milián G, Ranilla MJ, et al. 2008.** Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Cienc Tecnol Aliment* 6: 56-63.
 25. **Rothrock MJ Jr, Cook K, Warren J, Eiteman M, Sistani K. 2010.** Microbial mineralization of organic nitrogen forms in poultry litters. *J Environ Qual* 39: 1848-1857.
 26. **Shiva CM. 2007.** Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. España: Universidad Autónoma de Barcelona. 173 p.
 27. **Sifour M, Tayeb I, Haddar H, Namous H, Aissaoui S. 2012.** Production and characterization of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* F12 with inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. *TOJSAT* 2: 55-61.
 28. **Song Y, Kato N, Liu C, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K. 2000.** Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 187: 167-173.

29. **Stephenson D, Moore R, Allison G. 2009.** Comparison and utilization of repetitive-element PCR techniques for typing *Lactobacillus* isolates from the chicken gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 21: 6764-6776.
30. **Sumathi V, Reetha D. 2012.** Effect of storage time and temperature for maximum bacteriocin production by lactic acid bacteria. *IJPBA* 3: 831-834.
31. **Teanpaisan R, Dahlén G. 2006.** Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species. *Oral Microbiol Immunol* 21: 79-83.
32. **Torok V, Ophel-Keller K, Hughes R, Forder R, Ali M, Macalpine R. 2007.** Environment and age: impact on poultry gut microflora. In: *Proc XIX Australian Poultry Science Symposium*. New South Wales.
33. **Vásquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G. 2002.** Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women *J Clin Microbiol* 40: 2746-2749.
34. **Weesel JS, Anderson ME, Lowe A, Penno R, Da Costa TM, Button L, Goth KC. 2004.** Screening of the equine intestinal microflora for potential probiotic organisms. *Equine Vet J* 36: 351-355.
35. **Win W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. 2008.** *Koneman, diagnóstico microbiológico: texto atlas y en color*. 6^o ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 1475 p.